

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSTGRADO

**Caracterización molecular de una proteína similar a
ZP3 en alpacas (Lama pacos)**

TESIS

para optar al grado de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Luis Alberto Guzmán Masias

Lima-Perú

2009

A mis seres Queridos

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis fue posible gracias al apoyo de la “*International Genetic Engineering Biotechnology*” y al laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y forma parte del proyecto “Análisis Molecular de la Interacción Gamética en Alpacas”.

A mis padres por motivarme siempre a luchar por mis sueños y apoyarme durante toda mi carrera y durante el desarrollo de esta tesis. A mi hermana, cuyo amor fraternal me acompaña día a día. A mi familia entera, por su amor y buenos deseos.

A mi asesora, MSc. Martha Valdivia Cuya, Jefa del laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, por su apoyo y confianza, así como a cada uno de los miembros investigadores de su laboratorio por su amistad y colaboración.

A Ricardo Pella Cáceres, mi gran amigo, que supo guiarme con sus consejos y apoyarme en el deseo de seguir adelante.

Un agradecimiento especial a Susan Pérez Gamarra, incondicional amiga, por su colaboración y paciencia, por las largas jornadas de trabajo, los gratos momentos e incontables lecciones juntos.

A mis amigos y compañeros con los que compartí y aprendí “lecciones de vida”.

A todos aquellas personas que no menciono, quiero que sepan que Muchas Gracias por su apoyo.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| I.- Resumen | IV |
| II.- Abstract | V |
| III.- Introducción | 1 |
| IV.- Antecedentes | |
| 1. La Alpaca y su Fisiología Reproductiva. | 3 |
| 2. Anatomía del Sistema Reproductor de la Alpaca Hembra. | 4 |
| 3. La Onda Folicular en las Alpacas y la Morfología del Complejo Cumulus-Ovocito del folículo en Camélidos Sudamericanos. | 4 |
| 4. Perfil de la Fecundación en Mamíferos y la Interacción Gamética. | 6 |
| 5. La Zona Pelúcida. | 6 |
| 6. Capacitación Espermiática, Acrosoma y Reacción Acrosómica. | 8 |
| V.- Hipótesis y Objetivos | 11 |
| VI.- Materiales y Métodos | |
| 1. Aislamiento de Zonas Pelúcidas en Mamíferos | 12 |
| 2. Análisis Molecular | 12 |
| 3. Análisis <i>In-Silico</i> de las Proteínas de ZP3 en Mamíferos | 13 |
| 4. Determinación Específica de la proteína similar a ZP3 en Alpaca – Western Blot | 13 |
| 5. Pruebas Funcionales | 14 |
| VII.- Resultados | |
| 1. Aislamiento y Análisis Molecular de las Glicoproteínas de Zona Pelúcida en Alpacas. | 17 |
| 2. Pruebas Funcionales e Interacción Gamética. | 18 |
| VIII.- Discusión | 24 |
| IX.- Conclusiones | 29 |
| X.- Recomendaciones | 30 |
| XI.- Referencias Bibliográficas | 31 |
| XII.- Anexos | 38 |

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA SIMILAR A ZP3 EN ALPACAS (*Lama pacos*)

I.- RESUMEN

En las zonas alto-andinas del Perú, donde la agricultura y ganadería común no son viables, la crianza de camélidos, como la alpaca, constituye el único medio de subsistencia y principal actividad económica de las familias campesinas. Por tanto, el estudio de la fisiología reproductiva de la alpaca es indispensable para el establecimiento de proyectos de mejoramiento genético y reproducción asistida.

Las proteínas que participan en la interacción de los gametos de las alpacas son desconocidas, es por ello que el presente trabajo planteó determinar la expresión proteica y la caracterización de una proteína de Zona Pelúcida (ZP) que induzca espontáneamente la reacción acrosómica (RA) en ovocitos de alpacas.

En la mayoría de mamíferos la ZP está conformada por tres glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3. En el presente trabajo se demostró que en las alpacas existen también 3 glicoproteínas con pesos moleculares de 110 kDa, 75 kDa y 65 kDa correspondientes a ZP1a, ZP2a y ZP3a, respectivamente.

La ZP3 es el agonista natural de la RA en espermatozoides de la misma especie, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que ZP3a es capaz de inducir la RA tanto en espermatozoides de ratón como en los de su propia especie.

De esta manera, este estudio ayuda al mejor entendimiento de la naturaleza de las glicoproteínas de ZP en alpacas.

Palabras Clave.- Capacitación Espermática, Reacción Acrosómica, Zona Pelúcida, proteína ZP3

II.- ABSTRACT

In areas of high-Andean Peru, where agriculture and livestock are not viable, the breeding of camels, such as alpaca is the only means of livelihood and main economic activity of farm households. Therefore, the study of the reproductive physiology of alpacas is essential to the establishment of projects in assisted reproduction and genetic improvement.

The proteins involved in the interaction of the alpaca's gametes are unknown; therefore the present determined the protein expression and characterization of a zona pellucida (ZP), which induce the spontaneous acrosome reaction (AR) in oocytes of alpacas.

In most mammals, the zona pellucida (ZP) is composed by three glycoproteins ZP1, ZP2 and ZP3. In this research demonstrated that in Alpacas there are also 3 glycoproteins with molecular weights of 110 kDa, 75 kDa and 65 kDa corresponding to aZP1, aZP2 and aZP3, respectively.

ZP3 is the natural agonist of the acrosome reaction (AR) in spermatozoa of the same species, however, our results obtained in this research showed that aZP3 can also induce RA in mouse sperm and in their own species.

Therefore, this study helps to better understand the nature of the zona pellucida glycoproteins in alpacas.

Keywords.- Sperm capacitation, acrosome reaction, Zona Pellucida, ZP3 protein.

III.- INTRODUCCIÓN

Los camélidos de América del Sur pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Ruminantia, familia Camelidae y en la actualidad están representados por 2 especies silvestres: Guanaco (*Lama guanicoe*) y Vicuña (*Lama vicugna*); y 2 especies domésticas: Llama (*Lama glama*) y Alpaca (*Lama pacos*).

La crianza de alpacas y llamas constituye una actividad económica de gran importancia para un vasto sector de la población alto andina, principalmente de Perú y Bolivia y, en menor grado de Argentina, Chile y Ecuador. Se estima que alrededor de 500 mil familias campesinas de la región Andina dependen directamente de la actividad con camélidos sudamericanos, además de otras que se benefician indirectamente de ella.

Los principales productos que se obtienen de los camélidos sudamericanos son:

1. La fibra, principalmente de vicuña y alpaca, cuyas características singulares hacen que tengan en general una altísima cotización en el mercado internacional.
2. La carne, cuyo valor nutritivo es superior a las carnes rojas y proviene de animales alimentados en praderas naturales sobre los 3 800 msnm.
3. Las pieles y cueros, con múltiples usos industriales y artesanales.
4. El estiércol que se usa como fertilizante o como combustible.
5. Además, por su tamaño y fortaleza se utiliza también como animal de carga y cumple un papel importante en el transporte en las áreas rurales carentes de vías de comunicación.

En las zonas altas del Perú, hogar de más de 1 000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cuzco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno donde la agricultura y ganadería común no son viables, la crianza

de los camélidos constituye el único medio de subsistencia de las familias campesinas (Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos, CONACS).

La importancia económica de los camélidos sudamericanos, y en especial de las alpacas, para nuestros pobladores peruanos alto-andinos es indiscutible. Por tanto, los estudios enfocados a encontrar nuevos marcadores de pureza, marcadores genéticos ligados a susceptibilidad a enfermedades o fineza de fibra, la búsqueda de vacunas y los estudios enfocados en la fisiología molecular reproductiva están completamente justificados y la información científica que se desprenda de estas investigaciones será la base del desarrollo de programas nacionales de mejoramiento genético de los camélidos.

En la actualidad no se conoce el mecanismo y sobre todo las moléculas que participan en la interacción gamética en alpacas y si estas se han mantenido a través de la evolución en los mamíferos. Existe un consenso general en que las glicoproteínas de ZP sirven como barrera para la fertilización de ovocitos de una especie por espermatozoides de otra especie y además evita la poliespermia. Se piensa que este reconocimiento se deba a receptores especie-específicos en la ZP que puedan ser reconocidos primariamente por los espermatozoides de la misma especie.

El presente trabajo busca comprender la fisiología molecular reproductiva de la alpaca, a nivel de las proteínas de interacción gamética del ovocito-espermatozoide. Así, el objetivo del estudio es determinar la expresión proteica y la caracterización de una proteína que induzca espontáneamente la RA.

IV.-ANTECEDENTES

1.- LA ALPACA Y SU FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA

La historia evolutiva de la alpaca (*Lama pacos*) se inicia con la aparición de los camélidos ancestrales en América del Norte al final del Plioceno, hace tres millones de años. Luego de su migración a través del estrecho de Bering hacia África y Asia, evolucionaron para formar la tribu de los Camelini, que comprende al camello Bactriano Moderno (el cual habita en Asia y presenta dos jorobas) y al Dromedario o camello con una joroba (que se encuentra en el Cercano Oriente y Norte de África). Asimismo, otro grupo migró hacia el sur a través del Istmo de Panamá y se distribuyó en América del Sur, donde surgió la tribu de los Lamini. Finalmente, los camélidos ancestrales desaparecieron de América del Norte.

La alpaca y la llama pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Tylapoda (callos y almohadillas en las patas) y a la familia Camelidae (cuello largo con cabeza pequeña, con 2 dedos en cada pata). Existen 2 grupos de camélidos: los camélidos del Viejo Mundo (camélidos con jorobas) y los del Nuevo Mundo (camélidos sin jorobas) que pertenecen al género *Lama* e incluyen a *Lama glama* (Llama), *Lama pacos* (Alpaca), *Lama guanicoe* (Guanaco) y *Lama vicugna* (Vicuña). Las primeras 2 especies del género *Lama* son animales domesticados, mientras que las últimas son especies silvestres. Todos los miembros de la familia tienen 37 cromosomas y se ha reportado que las 2 especies del Viejo Mundo pueden cruzarse entre ellas y producir descendencia fértil. Similares observaciones han sido realizadas entre las especies de camélidos del Nuevo Mundo (Escobar, 1984; Sumar, 1983 y Wheeler, 1988).

Las alpacas son animales pequeños, de orejas cortas y paradas, usadas por los pobladores de las regiones alto-andinas principalmente por su fibra, sin embargo cobran importancia socio-económica por el

aprovechamiento de su carne y productos derivados como el cuero (Escobar, 1984; Sumar, 1983). La alpaca hembra tiene un peso promedio de 55 kg y el macho de 60 a 80 kg y poseen una fibra muy fina con colores que varían entre el blanco, negro y marrón.

2.- ANATOMIA DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA ALPACA HEMBRA

Anatómicamente; la alpaca hembra tiene una sola cervix, 2 cuernos uterinos, 2 tubos uterinos (oviductos), bursa ovárica y dos ovarios. Los ovarios son de forma oval con una textura irregular en la palpación (Sumar, 1983) y son similares a los ovarios de bovino. Los folículos pre-ovulatorios varían entre 7 a 12 mm de diámetro, sin embargo se ha observado algunas de hasta 16 mm (Adams *et al.*, 1989). Generalmente, los ovarios tienen múltiples folículos pequeños (1 a 3 mm) que no pueden ser detectados por palpación (Escobar RC, 1984; Sumar J, 1983); y son sólo los que tienen más de 8 mm aquellos que pueden ser palpados por su estructura anatómicamente turgente. El oviducto es tortuoso y se localiza entre el ovario y los cuernos uterinos, dentro de la bursa ovárica (Figura 1). Debido a la longitud y tortuosidad del oviducto la distancia entre el extremo del cuerno uterino y el ovario varía de animal en animal (Escobar, 1984).

3.- LA ONDA FOLICULAR EN LAS ALPACAS Y LA MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO CUMULUS – OVOCITO DEL FOLICULO EN LOS CAMELIDOS SUDAMERICOS.

La ovulación en las alpacas es del tipo inducida y su estudio es importante para el mejor entendimiento de su fisiología reproductiva y del futuro de técnicas de mejoramiento genético de camélidos, además de la sincronización ovárica, superovulación, recojo de ovocitos maduros y Fecundación *in-vitro*. El conocer cómo es que ocurre el fenómeno de ovulación inducida en alpacas brindará un mejor entendimiento del medio fisiológico que rodea las proteínas que participan en el proceso de

fecundación. En Australia, el grupo del Dr. Vauhghan *et al.*, (2004), trabajó con los ovarios de 16 alpacas hembras aisladas en sus corrales de los machos, que fueron monitoreados por ultrasonido cada 48 horas por un periodo de un año entre los 46 (n=8) y 100 (n=8) días después del aislamiento. Los investigadores observaron la presencia de 8 a 10 folículos de menos de 3 mm de diámetro por onda folicular, seguido del desarrollo de usualmente uno de ellos; sin embargo en algunos casos desarrollaban 2 o 3 folículos de hasta 3 – 5 mm y a partir de esto sólo el folículo dominante continuaba desarrollando, mientras los otros regresionaban. Si bien es conocida la ovulación inducida, ellos observaron 4 casos de ovulación espontánea y la presencia de más de un folículo dominante (>7 mm) fue determinada en 5 oportunidades. Observaron además que los folículos tenían una proporción de crecimiento diario de 0.43 ± 0.02 mm entre los días 0 y 10 y la mayoría de ellos tenían entre 6 – 7 mm a los 6 – 8 días. Generalmente, un diámetro folicular de 6 a 7 mm es considerado adecuado para que la ovulación y fertilización ocurra (Vauhghan *et al.*, 2003).

El intervalo entre 2 ondas resulta variable entre individuo e individuo y va desde 12 a 16 días habiendo individuos con intervalos de 18, 20 y 22 días. Esto concuerda con las características reportadas de intervalo entre onda folicular en estudios realizados en llamas de 11 días (Bravo *et al.*, 1989) o de 20 días (Adams *et al.*, 1990).

Un estudio de la morfología del complejo cumulus-ovocito (COC) en alpacas no ha sido realizado, sin embargo en llamas sí existe y se postula que puede extrapolarse para los camélidos sudamericanos. Por ejemplo Del Campo *et al.*, (1995), encontraron que el diámetro de los folículos de llama es de 8.6 ± 0.5 mm y que el COC se encuentra a un ángulo de localización de $64.8^\circ \pm 2.1$ respecto al sitio esperado de ovulación (Figura 2). Estos resultados nos ubican geométricamente en la posición esperada de los ovocitos de los camélidos sudamericanos dentro de cada folículo, y son datos relevantes para la punción y colección de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo folicular.

4.- PERFIL DE LA FECUNDACIÓN EN MAMÍFEROS Y LA INTERACCIÓN GAMÉTICA

Una vez que los espermatozoides han sido depositados en el tracto genital femenino y la ovulación se ha realizado, se postula que los espermatozoides son atraídos al ovocito por quimioatrayentes (péptidos termo-estables) emitidos por las células foliculares (Eisenbach, 1999b) y/o termo-atrayentes (gradiente de temperatura entre extremo distal y proximal del oviducto) (Eisenbach *et al.*, 1999a). Así, la fecundación en mamíferos ocurre en al menos cinco pasos, los cuales se suceden en un orden bastante estricto. De manera especie-específica, un espermatozoide con acrosoma intacto deberá unirse a la matriz proteica extracelular o ZP del ovocito (paso 1); una vez unido a la ZP, el espermatozoide debe experimentar la RA (paso 2), para luego penetrar la ZP y encontrarse en el espacio perivitelino (paso 3); a continuación el espermatozoide deberá unirse a la membrana plasmática del ovocito (paso 4) y finalmente fusionarse por completo con este último (paso 5) (Wassarman, 1999; Wassarman *et al.*, 2001).

5.- LA ZONA PELUCIDA

Existe un consenso general en que la ZP sirve como barrera para la fertilización de ovocitos de una especie por espermatozoides de otra especie y además evita la poliespermia. Se piensa que este reconocimiento se deba a receptores especie-específicos en la ZP que puedan ser reconocidos primariamente por los espermatozoides de la misma especie.

La ZP de ovocitos de ratón (~6 μm de ZP contiene ~3,5 ng de proteína) está compuesta por tres glicoproteínas llamadas ZP1m (~200 kDa, proteína homodimérica), ZP2m (~120 kDa), y ZP3m (~83 kDa) (Bleil *et al.*, 1980; Wassarman, 1988). Cada una de esas proteínas consiste de

un único polipéptido y son heterogéneamente glicosiladas con complejos del tipo *asparagina-N-linked* y *serina/treonina-O-linked*. Como consecuencia, cada una de las glicoproteínas es relativamente ácida y aparece como una banda ancha en geles de electroforesis. Cada uno de esos polipéptidos posee dominios conservados para cada glicoproteína de ZP, por ejemplo: el péptido señal, el sitio consenso de clivaje furínico, regiones hidrofóbicas y la llamada dominio ZP (Figura 3) (Litscher y Wassarman, 1996).

En ratones, las glicoproteínas de ZP son sintetizadas y secretadas por los ovocitos en crecimiento y las tres glicoproteínas se organizan de manera muy específica. En este modelo, la ZP está compuesta por largos filamentos interconectados que son polímeros de ZP2m y ZP3m. Un dímero (ZP2m y ZP3m) es localizado cada 140Å y estos se forman dispuestos en cadenas unidas por ZP1m para crear una matriz extracelular tridimensional (Figura 4).

En experimentos con ratones *knockout* y usando sondas *antisense* contra cada uno de las RNAm de las proteínas de ZP se reportó que la presencia de ambas ZP2m y ZP3m (en concentraciones equimolares 1:1) es requerida para el ensamblaje de la ZP nativa. Así, en animales *knockout* ZP3m *-/-* la matriz de ZP se pierde completamente, resultando en ratonas infértiles, y sólo una delgada ZP se forma en ratonas ZP3m *+/-*. Es importante notar que ratones ZP3m *-/-* exhiben un desarrollo folicular retardado en comparación con animales *wild-type*. Esta diferencia es reflejada en el tamaño de los ovarios. En general, los ovarios de ratones ZP3m *-/-* tienen pocos o casi ningún folículo secundario, por lo que fallan en producir ovocitos maduros (Rankin *et al.*, 1999; Rankin y Deam, 2000).

Durante la unión del espermatozoide al ovocito son sólo los espermatozoides con acrosoma intacto los que se unen a ovocitos ovulados y la evidencia experimental apoya fuertemente que ZP3m sirve como un receptor para estos espermatozoides (Bleil y Wassarman, 1980; Wassarman, 1988). Se ha demostrado que de las tres glicoproteínas que

constituyen la ZP, sólo los purificados de ZP3m se unen exclusivamente a las cabezas de los espermatozoides con acrosomas intactos (Figura 5) y en concentraciones nanomolares inhibe la unión a espermatozoides en ensayos de competencia (Mortillo y Wassarmar, 1991).

6.- CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA, ACROSOMA Y REACCIÓN ACROSÓMICA

Austin (1951, 1952) y Chang (1951) definieron la capacitación como el tiempo que el espermatozoide debe residir en el tracto reproductor femenino antes de que adquiriera la habilidad de fecundar al ovocito. Actualmente entendemos capacitación como una serie de cambios estructurales y funcionales que se inician después de que se remueven los factores estabilizantes presentes en el plasma seminal, continúan a través del tránsito por el tracto reproductor femenino y terminan cuando el espermatozoide es capaz de responder a los ligandos presentes en la ZP desplegando la reacción acrosómica (Perry *et al.*, 1996).

De esta manera, la capacitación implica una serie de procesos que incluyen el acoplamiento de los pasos de traducción de señales que regulan el inicio de la reacción acrosómica, la modificación de los patrones de movilidad del flagelo indispensable para penetrar la ZP, y el desarrollo de la capacidad de fusionarse con el ovocito (Bergqvist *et al.*, 2006). Todo ello acompañado de alteraciones en el metabolismo y características biofísicas de la membrana, cambios en el estado de fosforilación de las proteínas, elevación del pH intracelular y los niveles de calcio, y la hiperpolarización del potencial de membrana (Visconti *et al.*, 1998).

El acrosoma es una gran vesícula secretora ubicada en la región apical de la cabeza de los espermatozoides. La membrana acrosomal cubre la membrana plasmática y es llamada membrana acrosomal externa. Morfológicamente la reacción acrosómica es una fusión múltiple

entre la membrana acrosomal externa y la membrana citoplasmática en la región anterior de la cabeza del espermatozoide, que precede la liberación del contenido acrosomal y exposición de la membrana acrosomal interna (Brewis *et al.*, 1996). Los componentes del acrosoma son esenciales para la fecundación. La proteína principal es la acrosina (35 kDa), una endoproteasa con una actividad de clivaje tipo tripsina. Durante la meiosis, la acrosina llega a ser sintetizada como un zimógeno inactivo, pro-acrosina (53 kDa) la cual es almacenada en el acrosoma. Se cree que la función fisiológica de la acrosina estaría limitada a la proteólisis de la ZP (Bastiaan *et al.*, 2002).

Se ha aceptado que la glicoproteína de zona pelúcida ZP3 es el agonista natural de la reacción acrosómica. Las mismas clases de moléculas que participan en la secreción en células somáticas participan en la iniciación de la reacción acrosómica (Buffone *et al.*, 2009). Estas incluyen componentes de traducción de señales tales como proteínas G, fosfoinositoltrifosfato (IP3), receptores para IP3, fosfolipasa C, calcio y canales de calcio. Por ejemplo, la ZP3 activa las proteínas G espermáticas, despolariza la membrana plasmática (de -60 mV a -30 mV), activa los canales de calcio, incrementa el pH y aumenta la concentración intracelular de calcio (desde ~150 nM a ~400 nM) (Wassarman *et al.*, 2001).

Se conocen muchos inductores de la reacción acrosómica, sin embargo, es aceptado que la ZP3 es el agonista natural que inicia la reacción acrosómica al unirse a espermatozoides intactos (Figura 6). La unión de la ZP3 activa las proteínas G (Plessis *et al.*, 2001) del espermatozoide y los canales de calcio del tipo T resultando en una despolarización de la membrana del espermatozoide de ~-60mV a ~-30mV y un significativo incremento del calcio intercelular en 2 a 3 veces sus valores. La habilidad de ZP3 de actuar como receptor espermático *in vitro* no es significativamente afectada por altas temperaturas, detergentes o agentes reductores denaturantes o limitadas proteólisis. Es así que después de extensivas proteólisis de ZP3m, los pequeños

glicopolipéptidos producidos retienen la actividad de receptor espermático para inducir la RA (Litscher *et al.*,1995), aunque son requeridas altas concentraciones de glicopéptidos.

V.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

- Existe una proteína similar a ZP3 en alpacas que induce la RA en espermatozoides.

Objetivo

- Determinar la expresión proteica y la caracterización de una proteína que induzca espontáneamente la RA en alpacas.

Objetivos Específicos

- Aislar ZP's de alpacas.
- Demostrar por ensayos de Interacción Molecular que existe un agonista natural de la RA en los solubilizados de ZP de alpaca.
- Determinar similitudes estructurales del inductor de la RA entre diferentes especies.

- **VI.- MATERIALES Y MÉTODOS**

1.- Aislamiento de Zonas Pelúcidas de Alpacas y Ratones

El aislamiento de ZPs se realizó a partir de los ovarios de alpacas del departamento de Huancavelica-Perú y de ratones hembras de la cepa Swiss-Rockefeller. Estas últimas de seis semanas de edad postnatal, fueron mantenidas con un fotoperíodo de 14 horas luz/10 horas oscuridad, y luego de ser sacrificadas, se realizó la disección de la zona ventral para extraer los ovarios y colocarlos en Buffer Fosfato Salino (PBS). Se disgregó el tejido ovárico y las ZP fueron reconocidas bajo el microscopio-estereoscopio, colectadas con la menor cantidad de volumen de PBS, transferidas a un tubo eppendorf de 200 μ l y centrifugadas a 16000 rpm por 15 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, se procedió a solubilizarlas a 68°C por una hora para luego centrifugarlas a 16000 rpm por 15 minutos. Finalmente, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante, el cual fue conservado a -20°C (Miller et al., 1992).

2.- Análisis Molecular

La cuantificación de la proteína total aislada fue realizada utilizando el Método de Bradford (Bradford, 1976). El aislamiento molecular de las glicoproteínas de ZP se realizó por electroforesis unidimensional (sistema Mini-proteína III Bio-Rad) SDS-PAGE al 10%, método Laemmli a 100V por 1 hora (Laemmli, 1970).

3.- Análisis *In-Silico* de las Proteínas de ZP3 en Mamíferos

Se utilizó la base de datos *GenBank* para conocer la secuencia de las proteínas de ZP3 de mamíferos euterianos; Se realizó el alineamiento múltiple con el programa *Clustal W* (Thompson, 1997; Larkin *et al.*, 2007), contrastando y determinando las posiciones conservadas y divergentes respecto a las secuencias de ZP3 de diferentes especies. Empleando *BioEdit* (Hall, 1999) se editó el alineamiento realizado con *Clustal W*. Las secuencias utilizadas para el alineamientos fueron las siguientes: *Homo sapiens* (NP_009086.4), *Sus scrofa* (BAA08093), *Bos taurus* (NP_776399.1), *Mus musculus* (NP_035906.1), *Felis catus* (NP_001009330.1), *Macaca radiata* (CAA57961.1), , *Canis lupus familiaris* (BAA08098.1), *Mustela putorius* (AAU14267), *Rattus norvegicus* (CAA71787.1).

4.- Determinación Específica de la proteína similar a ZP3 en Alpaca – Western Blot (Towbin et al., 1979)

1.- Transferencia de las Proteínas a la Membrana

Las proteínas de solubilizadas de ZP separadas por electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (Sigma) que previamente fue equilibrado por 10 minutos en buffer de transferencia (Tris base 0.025M, Glicina 0.192M, Metanol 20%, pH 8.3). La transferencia se realizo a 100mA durante 1 hora en una Miniprotein III (Bio-rad) según las especificaciones del fabricante.

2.- Inmunotinción para el Western Blot

Una vez transferidas las proteínas al papel de nitrocelulosa, la membrana fue incubada en una solución de bloqueo (suero de albumina bovina (BSA) 4%, IGSS *quality gelatin* 0.1% y NaN_3

2mM) por 30 minutos y posteriormente lavada con buffer de lavado (BSA 0.8%, IGSS *quality gelatin* 0.1% y NaN_3 2mM) por 5 minutos. Luego se procedió a la incubación con el anticuerpo policlonal primario (Anti ZP3 Humana preparado en conejo, Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de $\mu\text{g/mL}$ diluido en una solución de incubación (BSA 0.8%, IGSS *quality gelatin* 0.1%, suero normal 1% y NaN_3 2mM) por una hora en agitación constante. Usando el anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal AuroProbe OneGAR anti IgG de conejo (Invitrogen) a una dilución de 1 en 200 en buffer de incubación, se procedió a sumergir la membrana e incubada por 4 horas. La amplificación de la señal se realizó con plata (kit IntenSE BL, Invitrogen); la reacción de revelado fue detenida sumergiendo la membrana en agua destilada.

5.- Pruebas Funcionales.-

Espermatozoides de la cola de epidídimo de las especies de ratón (cepa Swiss-Rockefeller) y alpaca (Huancavelica-Perú) fueron aislados en solución salina balanceada de Earle suplementada con piruvato de sodio, suero sintético (SSR), HEPES, bicarbonato de sodio, albúmina sérica humana (HSA), heparina 10 IU/mL, penicilina 50 000 IU/mL, estreptomicina 50 mg/L y rojo fenol a 37° C, y posteriormente lavados con repetidas centrifugaciones a 600 rpm durante 5 minutos. Luego, el pellet fue colocado en solución salina balanceada de Earle suplementada con piruvato de sodio, SSR, albumina sérica humana (HSA), glucosa, bicarbonato de sodio, penicilina 50 000 IU/mL, estreptomicina 50 mg/L y rojo fenol y llevado a la incubadora a 37°C con 5% de CO_2 por 30 minutos en *swim-up*, con el objetivo de seleccionar solo los espermatozoides motiles; estos últimos fueron mantenidos medio de cultivo durante 2 horas para ratón y 5 horas para los espermatozoides de alpaca,

obteniendo espermatozoides capacitados *in vitro* (Manosalva, 2002).

Los espermatozoides capacitados fueron divididos en concentraciones iguales y expuestas a los aislados de ZP de ratón y alpaca, retirándose una alícuota de 20 µl de la solución de espermatozoides cada hora para el análisis de RA.

4.a.- Inmunocitoquímica

Los espermatozoides aislados fueron colocados en láminas con polilisina para su fijación con paraformaldehído por 10 minutos, lavados con PBS por 5 minutos y mantenidos en cámara húmeda por 24 horas. La muestra fue posteriormente incubada en solución de bloqueo (BSA 0.8%, IGSS 0.1%, suero sustituto 5%, NaN_3 2mM, pH 7.4) por 30 minutos, y lavada con buffer de lavado (BSA 0.8%, IGSS 0.1%, NaN_3) por 5 minutos. Luego de enfrentar la muestra con el C5F10 (anticuerpo monoclonal contra la proteína acrosina el cual da reacción cruzada con espermatozoides de alpaca y ratón) a una concentración de 1 µg/mL diluido en buffer de incubación (BSA 0.8%, IGSS 0.1%, suero sustituto 1%, NaN_3 2mM), la muestra fue lavada 3 veces en buffer de lavado durante 10 minutos. La incubación con Inmunogold “anti-mouse” diluido 1/50 en buffer de incubación se realizó durante toda la noche en oscuridad. Las muestras fueron lavadas 3 veces por 15 minutos en PBS, post-fijadas en glutaraldehído al 2%, lavadas con agua destilada por 5 minutos y amplificadas con plata; la reacción fue detenida con agua destilada y las láminas fueron vistas al microscopio para su análisis.

4.b.- Estadística

La comparación estadística de los parámetros evaluados se hizo con prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis con

un nivel de significancia $p > 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico MINITAB versión 14.0.

VII.- RESULTADOS

1.- Aislamiento y Análisis Molecular de las Glicoproteínas de Zona Pelúcida en Alpacas

Las ZPs aisladas a partir de los ovarios de alpaca y ratón (Figura 7) y solubilizadas a 68 °C en PBS fueron cuantificadas por el método de Bradford obteniendo como promedio por cada 200 ZPs aisladas de alpaca, una concentración de $2,35 \pm 0.29$ mg/mL de proteínas de ZPs. El aislamiento molecular de las proteínas de ZP de alpaca en geles SDS-PAGE al 10% indica que alpaca posee 3 glicoproteínas de ZP correspondientes a 110 kDa, 75 kDa y 65 kDa los cuales corresponderían a proteínas similares a ZP1, ZP2 y ZP3 respectivamente, este es el primer reporte de aislamiento molecular y definición de los pesos moleculares para las ZPs en alpacas. (Figura 8).

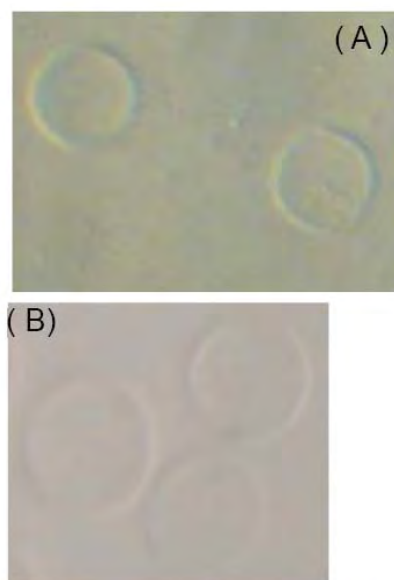


Figura 7.- Zonas Pelúcidas de ratón (A) y de alpacas (B) aisladas manualmente (40X)

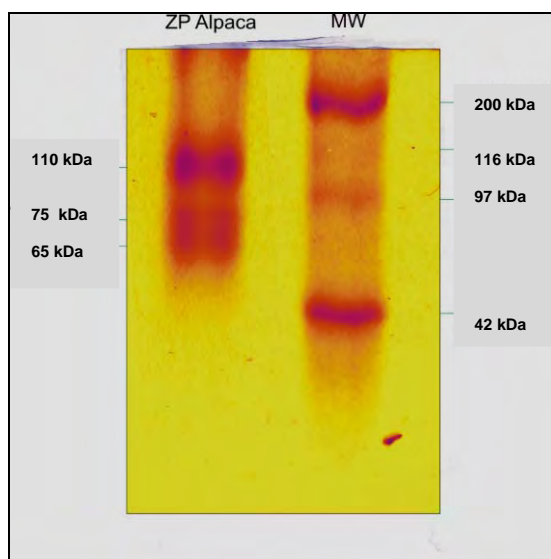


Figura 8: Aislado protéico de glicoproteínas de ZP de alpaca. Se observan tres bandas de 110 kDa, 75 kDa y 65 kDa.

2.- Pruebas Funcionales e Interacción Gamética

Para determinar que los solubilizados de ZP de alpaca se encuentra un inductor de la RA se utilizaron espermatozoides obtenidos a partir de la cola de epidídimo de alpacas y ratones Swiss-Rockefeller a una concentración de $4,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Luego de realizado el proceso de selección espermática y capacitación *in vitro* la motilidad espermática fue mayor al 95% y se trabajó con una muestra 10 veces diluida a partir de la concentración inicial y solubilizado de proteínas de ZP de ratón (concentración total aislada es de 0,78 mg/mL en 200 ZPs) como grupo control y ZP de alpaca ($2,35 \pm 0,29$ mg/mL) obteniéndose reacción acrosómica inducida intraespecie e interespecífica. La Tabla 1 resume los porcentajes de evaluación del estado del acrosoma en espermatozoides de ratón capacitados *in vitro* posterior a la incubación con solubilizados de ZP ratón y dos diferentes concentraciones de proteínas de ZP de alpaca. Para determinar que esta interacción también

ocurre a nivel macromolecular se realizó ensayos de interacción gamética *in vitro* donde se observó que espermatozoides capacitados de ratón se unen a ovócitos no fecundados y a matrices de ZP como se observa en la Figura 9.

| | Hora 1 | Hora 2 | Hora 3 | Hora 4 |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Control (0 mg/mL) | 12,9% | 17,33% | 18,64% | 13,04% |
| ZP Ratón (0.78 mg/mL) | 57,14% [*] | 54,17% [*] | 83,33% [*] | 79,79% [*] |
| ZP Alpaca (0.78 mg/mL) | 17,84% [£] | 24,32% [£] | 36,95% [£] | 53,33% [£] |
| ZP Alpaca (2.35 mg/mL) | 16,07% [¥] | 41,86% [¥] | 42,62% [¥] | 62,5% [¥] |

Tabla 1: Porcentaje de espermatozoides de ratón que experimentaron reacción acrosómica en presencia de soluciones de ZP de alpaca y ratón. Se utilizó concentraciones de proteínas solubilizadas de alpaca en concentraciones iguales a las de ratón y 2,7 veces más concentrada. ^{*}, [£], [¥] Representan diferencia significativa en cada hora evaluada respecto al grupo control y entre los tratamientos ($p < 0,05$).

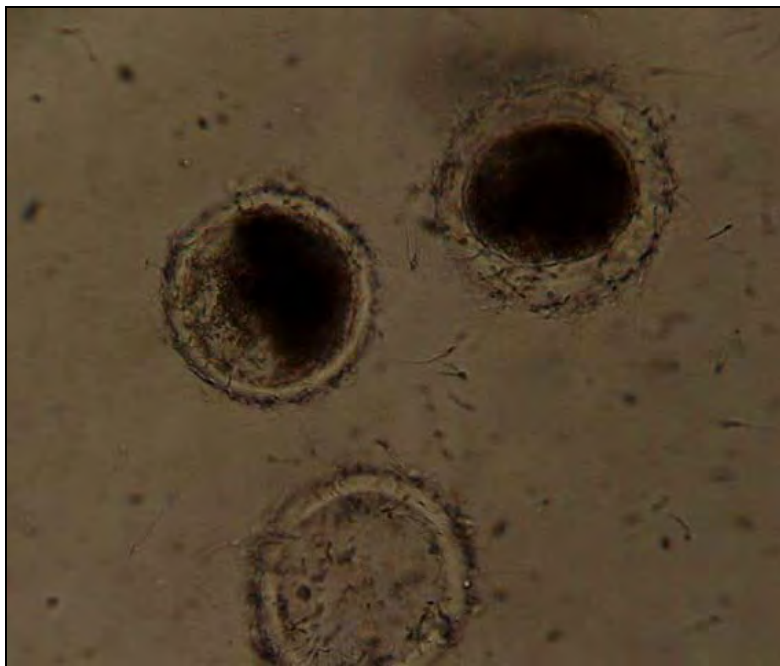


Figura 9.- Interacción Gamética de Espermatozoides de Ratón con Zonas Pelúcidas de Alpacas.

En un experimento independiente se enfrentó espermatozoides de alpaca capacitados *in vitro* con solubilizados de ZP de alpaca. Los resultados se resumen en la Figura 10, donde se muestra el porcentaje de reacción acrosómica. El estado del acrosoma fue evaluado de acuerdo a la presencia del acrosoma refringente en un espermatozoide no reaccionado y la presencia de una región acrosomal coloreada en uno reaccionado (Figura 11). Los resultados muestran que los solubilizados de ZP de alpaca también inducen la reacción acrosómica en los espermatozoides de la misma especie.

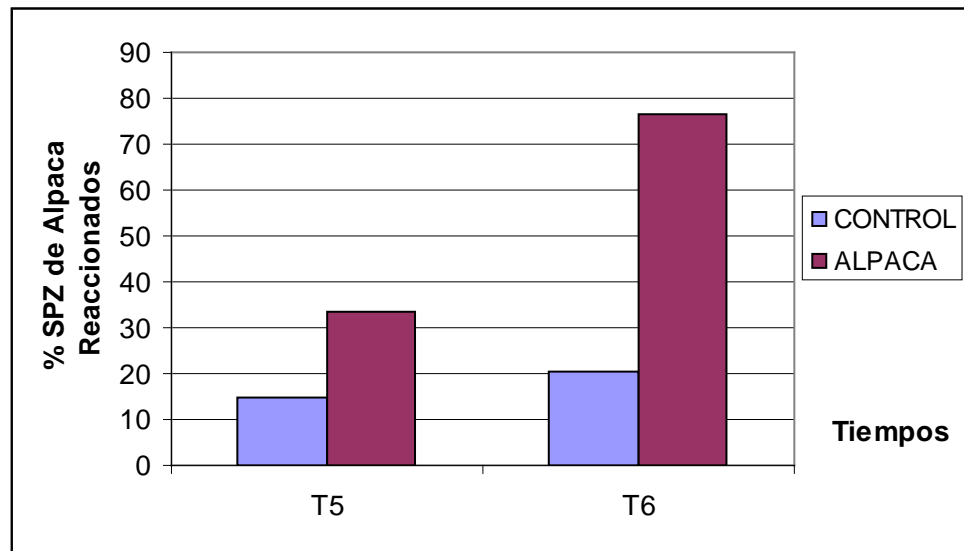


Figura 10: Porcentaje de Reacción Acrosómica en espermatozoides de cola de epidídimo de alpaca capacitados *in vitro*. T5 y T6 son horas post-capacitación *in vitro* en las que fueron evaluados los porcentajes de inducción.

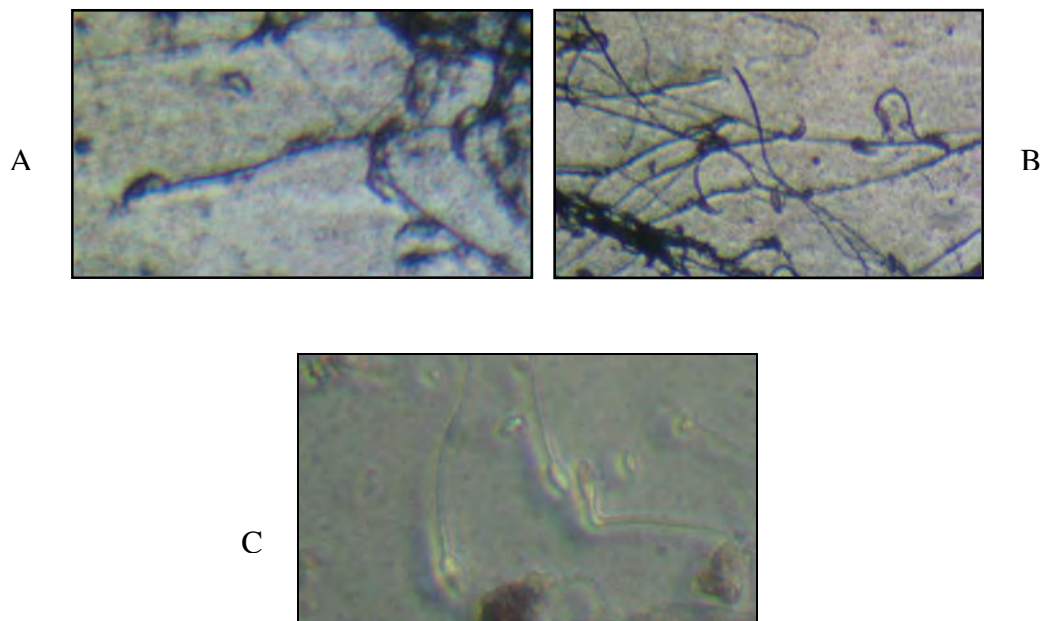


Figura 11: Pruebas Funcionales. A y B, Espermatozoides de ratón mostrando reacción acrosómica inducida por proteínas solubilizadas de ZP de alpaca. C, espermatozoides de alpaca mostrando reacción acrosómica inducida por proteínas de ZP de alpaca.

```

Homo      1  MVMVSKDLFGTGKLIKRAADLTGLPEACEPLVSMDDTDVVRFEVGLHECGNSMQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSIVRT
Sus       1  VVTVSKDLFGTGKLIKRAPADLTGLPAKCEPLVSDTDDVVRFEVGLHECGSSLOVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
Bos       1  VVTVDKDLFGTGKLIKRAPADLTGLPDNCEPLVSDTDDVVRFEVGLHECGNLOVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
Mus       1  VVTVSKDLFGTGKLIKRAPADLTGLSECCQPLVSDTDDVVRFEVGLHECGSSRVQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
Felis     1  VVMVSKDLFGTGKLIKRAPADLTGLPEACEPLVSDTDDVVRFEVGLHECGNSMQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
Macaca    1  VVTVSKDLFGTGKLIKRAPADLTGLPEACEPLVSDTDDVVRFEVGLHECGSSMQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSIVRT
Mustela   1  VVTVSKDLFGTGKLIKRAPADLTGLPENCEPLVSDTDDVVRFEVGLHECGNSRVQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
Canis     1  VVTVSKDLFGTGKLIKRAPADLTGLPENCEPLVSDTDDVVRFEVGLHECGSSRVQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
Rattus    1  VVTARVDLFGTGKLIKRAPADLTGLSECCQPLVSDTDDVVRFEVGLHECGSSRVQVTDALVYSTFLLHDPFVGNLSILRT
consensus 1  vVtvskdlFGTGKLIKrapADLTglpe CePlvsmDtdddvVRfevgLHeCgs vQvTddALVYSTFLLHdPrPvgnLSiIRT

Homo      81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Sus       81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Bos       81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Mus       81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Felis     81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Macaca    81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Mustela   81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Canis     81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
Rattus    81  NRAEVPICRYPRQGNVSSQAILPTWVPFRTTVSEEKLVFSLRLMEENWNAERKSPTFFHGLGDAHLQAEVHTGSHVPLR
consensus 81  NRAEvPIECrYPRqGNVSS aILPTWvPFrtTv sEEKLV FSLRLMEENW tEK sPTFqLGdvAhLQAEvHTGShVPLR

Homo      161  LFDVHCVAATLT--PDQNASFYHTIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Sus       161  LFDVHCVAATLT--PDQNTSPSHITIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRGPETLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Bos       161  LFDVHCVAATLT--PDQNTSPSHITIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Mus       161  LFDVHCVAATLT--PDQNTSPSHITIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Felis     161  LFDVHCVAATLT--PDQNASFYHTIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Macaca    161  LFDVHCVAATLT--PDQNASFYHTIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRGPETLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Mustela   161  LFDVHCVAATLT--PDQNTSPSHITIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Canis     161  LFDVHCVAATLT--PDQNTSPSHITIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
Rattus    161  LFDVHCVAATLT--PDQNTSPSHITIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRRPPTLQFTVDVVFHFANDSRNMIYITCHLKVTPLA
consensus 161  LFDVhCVAAtlt Pd n sP HtIVdFHGCLVDGLtdasSaFk PRPrPeTLQFTVdVfHFAndSRnMiYITChLkVtPa

Homo      239  EQDPDELNKACSFKSSNRWSPVEGADICCCCNKGGCGTPSHSRROPHVMSQNSR--SASRNRHHVTEADVTVGPIIF
Sus       239  DRVPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSLSRKLSMPKRO----SAPRSRRHHVTEADVTVGPIIF
Bos       239  DRVPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSLSRKLSMPKRO----SAPRSRRHHVTEADVTVGPIIF
Mus       240  NQIPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSLSRKLSMPKRO----SAPRSRRHHVTEADVTVGPIIF
Felis     239  SRVPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSLSRKLSMPKRO----SAPRSRRHHVTEADVTVGPIIF
Macaca    239  EQDPDELNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSHSRROPHVMSQNSR--SASRNRHHVTEADVTVGPIIF
Mustela   239  DRVPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSLSRKLSMPKRO----SAPRSRRHHVTEADVTVGPIIF
Canis     239  DRVPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSLSRKLSMPKRO----SAPRSRRHHVTEADVTVGPIIF
Rattus    240  NQIPDQLNKACSFKSSNRWSPVEGPAVICRCCCHKGCCGTPSHSRROPHVMSQNSR--SASRNRHHVTEADVTVGPIIF
consensus 241  ervPdQLNKACSF Kssnrw PVEG adic CC kG Cg pshSrrrshv rqw r s sRNRHHVTEADvTVGPIIF

Homo      317  LDRRGDHEVEQWALPSDTSVVLGLGVLAVVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Sus       314  LGKTSDHGVEGSTSS--PTSVMLGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Bos       314  LGRMNDRGVEGSTSS--PTSVMLGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Mus       318  LGKANDQVEGWATAS-AQTSVALGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Felis     317  LGKANDRGVEGSTSS--HTSVMLGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Macaca    317  LDRSADYEVEQWALPADTSVLLGLGVLAVVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Mustela   319  LGKAGDPPGVEGSTSS--HTSVMLGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Canis     319  LGKASDHGVEGSTSS--HTSVMLGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
Rattus    318  LGKANDQAVEGWATAS-AQTSVALGGLATVSLTLTAIVLVLTRRCRTASH---PVSASE
consensus 321  Lgka DhgvEg tsp tsvmLGGLATVslTLTaaivLgltr rtaSh vcpvSasq

```

Figura 12.- Alineamiento de las secuencias de proteínas de ZP3 de mamíferos. Se observa el nivel de homología existente entre las proteínas de ZP3 de Mamíferos Euterianos. *Homo sapiens* (NP_009086.4), *Sus scrofa* (BAA08093), *Bos taurus* (NP_776399.1), *Mus musculus* (NP_035906.1), *Felis catus* (NP_001009330.1), *Macaca radiata* (CAA57961.1), *Mustela putorius* (AAU14267), *Canis lupus familiaris* (BAA08098.1), *Rattus norvegicus* (CAA71787.1).

Para demostrar que se estaba trabajando con el agonista natural de la reacción acrosómica se usó el anticuerpo policlonal Anti-ZP3 (IgG policlonal de conejo), el cual reconoce las regiones de los aminoácidos

del 23 al 322 de la proteína ZP3 humana, este anticuerpo ha demostrado dar reacción cruzada con moléculas de ZP de ratón, rata y conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), asimismo, se puede observar el porcentaje de la homología existente entre las secuencias proteicas de ZP3 en los mamíferos euterianos (Figura 12). De esta manera se detectó por reacción inmunológica cruzada en el ensayo de Western Blot (Figura 13) la expresión de ZP3 de alpaca (ZP3a), demostrando así que existe una homología en las secuencias de aminoácidos de las ZP3 en mamíferos.

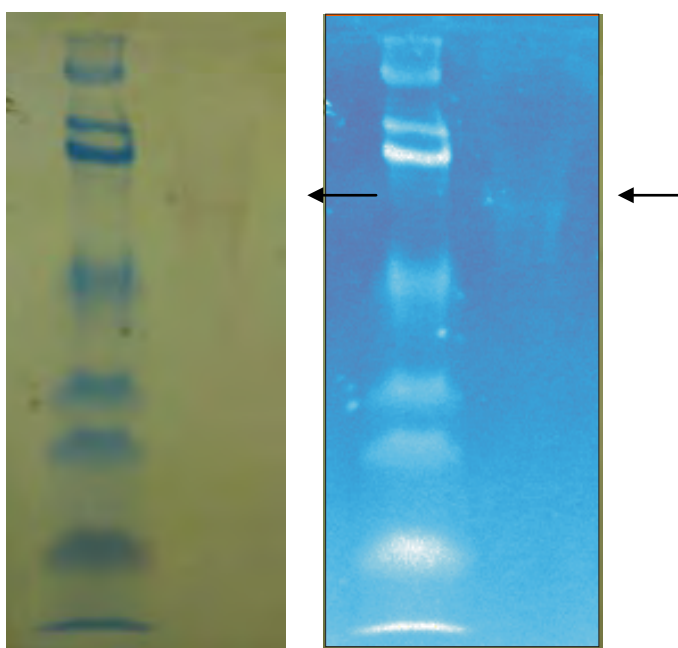


Figura 13.- Western Blot de ZP3 de Alpacas utilizando como anticuerpo primario un Anti ZP3 IgG de conejo, la flecha indica la presencia de la ZP3a.

VIII.- DISCUSIÓN

El proceso de interacción gamética en mamíferos es completado por la interacción directa del espermatozoide y el ovocito, un proceso mediado principalmente por las proteínas de superficie de los gametos. De esta manera, los estudios en esta materia están abocados a explorar las capacidades de los distintos grupos de estas proteínas. El primer paso que un espermatozoide debe superar es penetrar las células del cúmulus, donde se ha identificado que proteínas espermáticas como la PH-20 y la hialuronidasa juegan un rol importante; luego interactuará con las glicoproteínas de ZP, para finalmente unirse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. El presente trabajo de tesis está abocado en identificar un inductor de RA en la ZP solubilizada de Alpaca.

Por tanto, se ha identificado en geles unidimensionales bajo condiciones denaturantes 3 glicoproteínas de ZP en alpacas (Figura 8) correspondientes a 110 kDa, 75 kDa y 65 kDa, a las cuales he denominado ZP1a, ZP2a y ZP3a respectivamente. Esta caracterización molecular de las glicoproteínas de ZP observadas ha sido confirmada por Western Blot al utilizar anticuerpos policlonales antiZP3 que detectaron por reacción cruzada a la proteína ZP3a, confirmando de esta manera que en alpacas se expresan proteínas similares a las expresadas en mamíferos. Estos resultados, además, son concordantes con los obtenidos por Pella (2009) y Pérez (2008) en la detección, amplificación y secuenciamiento de DNAC para las glicoproteínas de ZP de ZP3a y ZP2a respectivamente.

La reacción acrosómica es un proceso que, *in vivo*, ocurre tras la capacitación y consiste en la exocitosis que se produce como consecuencia de la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa, provocando la liberación del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994). El tiempo necesario para que se produzca dicho proceso varía según las condiciones y la especie. En

ratón oscila desde 2 minutos, utilizando ZP solubilizada para la estimulación, hasta 130 minutos con ZP intacta (Lee *et al.*, 1989; Rockwell *et al.*, 2000). En humanos, Morales *et al.*, (1994) observaron tiempos entre 15 y 60 minutos utilizando ZP intacta.

La reacción acrosómica está mediada por una compleja interacción de señales celulares, las cuales incluyen activación de proteínas quinasas y su consecuente fosforilación, activación de canales iónicos y otros procesos aún por definir (Aitken, 1997; Breitbart, 1997; 2002; Visconti *et al.*, 1999; Herrick *et al.*, 2005), aunque algunos de estos se describen como característicos del proceso de capacitación.

Se acepta que la ZP proporciona receptores específicos de especie para la unión del espermatozoide, sin embargo, se desconoce si la RA es el mecanismo por el cual se establece el reconocimiento de especie y también se desconoce el lugar en el cual ocurre la RA durante la fecundación en condiciones fisiológicas (Kirkman-Brown *et al.*, 2002; Zhuang *et al.*, 2009). En base a los resultados del presente trabajo la inducción de la RA en las especies estudiadas apoya la hipótesis que la RA es un mecanismo que no está limitado a ser especie-específico al observar que solubilizados de ZP de alpaca inducen RA en espermatozoides de ratón.

Se propone que el espermatozoide se une a la ZP3, probablemente mediante oligosacáridos, al menos a través de dos receptores diferentes a nivel de su membrana plasmática. Uno de los receptores (R) está acoplado a una proteína G, la cual activa la fosfolipasa C b1 (PLC b1) y que a su vez activa la proteína quinasa A (PKA). Esta PKA activaría un canal dependiente de calcio situado a nivel de la membrana acrosomal externa, que liberaría Ca^{2+} desde el interior del acrosoma hacia el citosol, induciendo la RA.

Es importante mencionar que la homología existente también en las secuencias de las proteínas implicadas en el proceso de fecundación,

tanto para las proteínas de los ovocitos como para proteínas espermáticas, son importantes para poder identificarlas a través de la evolución y verificar a qué nivel se han establecido las diferencias moleculares las cuales permiten el aislamiento reproductivo entre las diferentes especies (Goudet *et al.*, 2008). Así tenemos que, los porcentajes de identidad que presenta la secuencia de la proteína *in silico* de ZP3 y ZP2 de alpaca extraída a partir de la secuencia de DNAC correspondiente a la región del dominio ZP es de 84% y 74% respecto a la misma región de las glicoproteínas de ratón respectivamente (Pella, 2009 y Pérez, 2008) (Figura 12), estos resultados soportan la hipótesis que la inducción de RA especie inter-específica utilizando espermatozoides de ratón con solubilizados de ZP de alpaca ocurriría por el elevado porcentaje de similaridad en las secuencias de las proteínas implicadas en el proceso. Así tenemos que en el espermatozoide un gran número de receptores para proteínas de la ZP han sido identificados, pero su mecanismo de acción sigue sin conocerse totalmente. Se ha demostrado que identificar los receptores de las proteínas de la ZP es más complicado que determinar sus ligandos en la ZP, probablemente por la gran complejidad de la superficie espermática en comparación con la ZP (Thaler y Cardullo, 1996). Varios receptores han sido aislados basándose en su afinidad por la ZP.

A nivel del espermatozoide una de las moléculas más estudiadas como ligando de los receptores de la ZP ha sido la β -1,4 Galactosiltransferasa (Gal T). Entre sus funciones se encuentra la que le da nombre, su capacidad de añadir galactosa a las glicoproteínas y glicolípidos con residuos terminales N-acetilglucosamina. GalT-I como molécula de la membrana plasmática, puede actuar como un receptor específico de glicoproteína incluyendo ZP3 (Miller *et al.*, 1992; Shur *et al.* 2006). Todos los ligandos conocidos para GalT-I tienen residuos terminales N-acetilglucosamina. Sin embargo el terminal N-acetilglucosamina no es suficiente para que una glicoproteína se una como ligando. Por ejemplo, ZP1 y ZP2 tienen residuos N-acetilglucosamina como terminales no reducidos pero no son ligandos

para la GalT-I (Miller *et al.*, 1992). La importancia biológica de la GalT-I y la adhesión a ZP3 se ha comprobado en varios ensayos *in vitro*. En experimentos usando la ZP intacta, el bloqueo o eliminación de los residuos N-acetilglucosamina reduce la unión de espermatozoides (López *et al.*, 1985). Cuando dichos residuos N-acetilglucosamina son bloqueados o eliminados de la ZP3 solubilizada, ésta pierde su capacidad para unir espermatozoides (Miller *et al.*, 1992). Estos resultados sugieren que la interacción entre GalT-I y ZP3 es necesaria para la unión entre gametos. Sin embargo, parece no ser totalmente imprescindible, ya que Rodeheffer *et al.* (2004) demostraron la unión de espermatozoides a la ZP utilizando ratones transgénicos sin Gal T-I, aunque el número de espermatozoides unidos fue menor, por lo que se sugiere que en ovocitos ovulados existe otro ligando independiente de ZP3, además de Gal T-I, que permite la unión del espermatozoide a la ZP pero que no participa en la exocitosis del acrosoma. Así, se postula que tanto las secuencias de las proteínas como las modificaciones post-traduccionales de estas glicoproteínas de ZP y las secuencias de los receptores estarían conservadas entre alpacas y ratones. Además, para confirmar lo mencionado, diferentes investigadores han sugerido que esta modificación en la ZP3 podría ser debida a un cambio en los oligosacáridos que componen esta glicoproteína como consecuencia de la acción de las exoglicosidasas. (Miller *et al.*, 1992; 1993; Benoff, 1997).

En relación con las interacciones espermatozoide-ovocito heterólogas

Existen numerosos artículos publicados que cuestionan los dogmas clásicos aceptados por la comunidad científica, en relación a la estricta especificidad de especie en la unión entre espermatozoide y ovocito. Bedford (1977) publicó que existía cierto grado de interacción entre especies heterólogas a nivel de la unión espermatozoide-ovocito. Sin embargo planteó que el espermatozoide humano era un caso peculiar en el que aparentemente la unión respondía a una estricta especificidad de especie.

Posteriormente, se han descrito diferentes casos de interacción heteróloga entre espermatozoides porcinos y equinos con ZP bovina (Sinowatz, 2003); espermatozoides humanos y ZP solubilizada de hámster (Lee *et al.*, 1987) o unión de espermatozoides humanos a la molécula Gp273, responsable de la interacción en moluscos bivalvos (Delle Monache *et al.*, 2003; Focarelli *et al.*, 2003). De este modo se demuestra que el espermatozoide humano tampoco responde a una estricta especificidad de especie en la unión a ZP. Algunos de los casos de interacción heteróloga espermatozoide-ZP desencadenan la inducción de la RA, demostrando que no se trata de una simple interacción mecánica. En cuanto a la ZP, Zhu *et al.* (1999) demostraron que existe un alto grado de homología entre especies en la secuencia de aminoácidos de la ZP3. Esta proteína se considera responsable de la unión del espermatozoide en diferentes especies, entre ellas el ratón (Wassarman *et al.*, 2004). En el caso del cerdo y el hombre la homología a nivel de ZP3 es de 78,9 % (Zhu *et al.*, 1999).

Finalmente, Goudet *et al.* (2008) sugiere que se debe realizar un estudio más detallado sobre la estructura de las zonas pelúcidas dado que se hipotetizó inicialmente en ratones, que ZP3 es el receptor primario del espermatozoide; pero al existir similitud entre las secuencias de ZP2 y ZP3 en ratones, ambas podrían participar en este reconocimiento inicial. Conociendo la secuencia aminoacídica de estas proteínas y el patrón de glicosilación que presentan se podría dilucidar cual es el mecanismo de interacción de gametos especie-específico y este mismo mecanismo podría ser estudiado en alpacas y de esta manera entender en un contexto global de como es que ocurre el proceso de interacción gamética durante la fecundación en mamíferos.

IX.- CONCLUSIONES

- Las alpacas presentan tres glicoproteínas que rodean a sus ovocitos: ZP1a (110 kDa), ZP2a (75 kDa) y ZP3a (65 kDa).
- La ZP solubilizada de alpaca induce la reacción acrosómica en espermatozoides de alpaca por lo que la existencia de un agonista natural se hace evidente y es además capaz de inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón.
- La glicoproteína de 65 kDa de la ZP de alpaca presenta homologías estructurales a ZP3 de otras especies.

X.- RECOMENDACIONES

El conocimiento que se logra desprender del presente trabajo de investigación aporta en dos campos claramente definidos:

- 1.- Aumentar el conocimiento en ciencia básica acerca de la conformación de la matriz de ZP en alpacas, sin embargo profundizar en los estudios de interacción molecular proteica con los receptores espermáticos es un campo que aún no ha sido abordado y
- 2.- El uso de los aislados de ZP como vacunas contraceptivas en programas de mejoramiento genético (Eade *et al.*, 2009).

XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS GP; GRIFFIN PG; GINTHER OJ. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *Biology of Reproduction*. 1:551-558.
- ADAMS GP; SUMAR J; GINTHER OJ. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular wave in llamas (*Lama glama*). *Journal of Reproduction Fertility*. 90: 535-545.
- AITKEN RJ. 2006. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*. 29: 69-75.
- AUSTIN CR. 1951. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 4 (series B), 581-596.
- AUSTIN CR. 1952. The "capacitation" of sperm. *Nature* 170: 326.
- BASTIAAN HS; MENKVELD R; OEHNINGER S; FRANKEN DR. 2002. Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona binding assessments among subfertile men. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 19:329-334.
- BEDFORD JM. 1977. Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anatomical Record*. 188:477-87.
- BERGQVIST AS; BALLESTER J; JOHANNISSON A; HERNANDEZ M; LUNDEHEIM N; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. 2006. In vitro capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote* 14:259-273.
- BLEIL JD; WASSARMAN PM. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20: 873-882.
- BRADFORD M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- BRAVO PW; SUMAR J. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in Alpacas. *Animal Reproduction of Science*. 21: 271-281.
- BREITBART H; RUBINSTEIN S; LAX Y. 1997. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Review of Reproduction*. 2: 165-174.
-

- BREITBART H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular Cell of Endocrinology*. 22:139-144.
- BREWIS IA; CLAYTON R; BARRATT CL; HORNBY DP; MOORE HD. 1996. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 2:583-589
- BUFFONE MG; RODRIGUEZ-MIRANDA E; STOREY BT; GERTON GL. 2009. Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *Journal of Cell Physiology*. Publish online 16 April. DOI 10.1002/jcp.21781.
- CHANG MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
- DEL CAMPO MR; DEL CAMPO CH; MAPLETOFT RJ; GINTHER OJ. 1995. Morphology and localization of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas. *Theriogenology*. 43: 533-542.
- DELLE MONACHE S; FLORI F; DELLA GIOVAMPAOLA C; CAPONE A; LA SALA GB; ROSATI F; COLONNA R; TATONE C; FOCARELLI R. 2003. Gp273, the ligand molecule for sperm-egg interaction in the bivalve mollusk, *Unio elongatulus*, binds to and induces acrosome reaction in human spermatozoa through a protein kinase C-dependent pathway. *Biology of Reproduction*. 69:1779-1784.
- EADE J; ROBERTSON I; JAMES C. 2009. Contraceptive potential of porcine and feline zona pellucida A, B and C subunits in domestic cats. *Reproduction*. Publish online 11 March doi:10.1530/REP-08-0471.
- EISENBACH M; TUR-KASPA L. 1999a. Do Human egg attract spermatozoa?. *BioEssays*. 21: 203-210.
- EISENBACH M. 1999b. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Development Genetics*. 25: 87-94.
- ESCOBAR RC. 1984. Mating, Parturition, In: The Llama, Animal Breeding and Production of American Camelids. Talles Graficos de ABRIL, Lima, Peru, 1984;103-139 and 229-247.

- FOCARELLI R; CAPONE A; ERMINI L; DEL BUONO F; BATTISTA LA SALA G; BALASINI M; ROSATI F. 2003. Immunoglobulins against gp273, the ligand for sperm-egg interaction in the mollusc bivalve *Unio elongatulus*, are directed against charged O-linked oligosaccharide chains bearing a Lewis-like structure and interact with epitopes of the human zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development*. 64:226-234.
- GILBERT S. 2005. Biología del Desarrollo. Sexta Edición. Editorial Médica Panamericana. Página 202.
- GOUDET G; MUGNIER S; CALLEBAUT I; MONGET P. 2008. Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes during *evolution* of vertebrates. *Biology of Reproduction*. 78:796-806.
- HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95– 98.
- HERRICK SB; SCHWEISSINGER DL; KIM SW; BAYAN KR; MANN S; CARDULLO RA. 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Cell Physiology*. 202: 663-671.
- KIRKMAN-BROWN JC; LEFIEVRE L; BRAY C; STEWART PM; BARRATT CL; PUBLICOVER SJ. 2002. Inhibitors of receptor tyrosine kinases do not suppress progesterone-induced [Ca²⁺]_i signalling in human spermatozoa. *Molecular Human of Reproduction*. 8:326-332.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- LARKIN MA; BLACKSHIELDS G; BROWN NP; CHENNA R; MCGETTIGAN PA; MCWILLIAM H; VALENTIN F; WALLACE IM; WILM A; LOPEZ R; THOMPSON JD; GIBSON TJ; HIGGINS DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- LEE M; TRUCCO G; BECHTOL K; WUMMER N; KOPF G; BLASCO L; STOREY B. 1987. Capacitation and acrosome reactions in human

spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertility and Sterility*. 48: 649-658.

LITSCHER E; JUNTUNEN K; SEPPO A; PENTTILÄ L; NIEMELÄ R; RENKONEN O; WASSARMAN P. 1995 .Oligosaccharide Constructs with Defined Structures That Inhibit Binding of Mouse Sperm to Unfertilized Eggs *in Vitro*. *Biochemistry*. 34: 4662-4669.

LITSCHER ES; WASSARMAN PM. 1996. Characterization of a mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity in vitro. *Biochemistry*. 35: 3980-3985.

LOPEZ LC; BAYNA EM; LITOFF D; SHAPER NL; SHAPER JH; SHUR BD. 1985. Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *Journal of Cell Biology*. 101: 1501-1510.

MANOSALVA, I. 2002. Tesis para Optar al Título de Bióloga con Mención en Biología Celular y Genética. Capacitación *In Vitro* de espermatozoides de Alpaca. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

MILLER CC; FAYRER-HOSKEN RA; TIMMONS TM; LEE VH, CAUDLE AB; DUNBAR BS. 1992. Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis and immunological techniques. *Journal Reproduction and Fertility*. 96. 815-825.

MILLER DJ; MACEK MB; SHUR BD. 1992. Complementarity between sperm surface beta-1,4- galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*. 357:589-593.

MILLER DJ; GONG XH; DECHER G; SHUR BD. 1993. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *Journal of Cell Biology*. 123:1431-1440.

MORTILLO S; WASSARMAN PM. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane components. *Development* 113: 141-149.

- PELLA R. 2009. Tesis para optar al grado de Magister en Biología Molecular. *In press*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En Revisión.
- PÉREZ S. 2008. Tesis para optar al grado de Bachiller en Genética y Biotecnología. Aislamiento, Caracterización y Análisis del ADN codificante de la glicoproteína de Zona Pelúcida Tipo 2 (aZP2) de Alpaca (*Lama pacos*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- PERRY RL; BARRATT CL; WARREN MA; COOKE ID. 1996. Comparative study of the effect of human cervical mucus and a cervical mucus substitute, Healonid, on capacitation and the acrosome reaction of human spermatozoa in vitro. *Human Reproduction* 11:1055-1062.
- PLESSIS S; PAGE C; FRANKEN D. 2001. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation. *Andrology*. 33: 337 – 342.
- RANKIN T; TALBOT P, LEE E, DEAN J. 1999. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126:3847-3855.
- RANKIN T; DEAN J. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Review of Reproduction* 5:114-121.
- ROCKWELL P; STOREY B. 2000. Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca(2+) changes monitored by fluo-3. *Molecular Reproduction and Development*. 55: 335-349.
- RODEHEFFER C; SHUR BD. 2004. Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development* 131:503-512.
- SHUR BD; RODEHEFFER C; ENSSLIN MA; LYNG R, RAYMOND A. 2006. Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Molecular Cell Endocrinology*. 250:137-148.

- SINOWATZ F; WESSA E; NEUMULLER C; PALMA G. 2003. On the species Specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reproduction in Domestic Animals*. 38: 141-146.
- SUMAR J. 1983. Studies on Reproductive Pathology in alpacas. Masters Thesis. Swedish University of Agriculture & Sciences, Uppsala and Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 9-103.
- THALER CD; CARDULLO RA. 1996. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 23289-23297.
- THOMPSON JD; GIBSON T J; PLEWNIAK F; JEANMOUGIN F; HIGGINS DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 24:4876-4882.
- TOWBIN H; STAEGELIN T; GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proceedings of the National Academy of Sciences* 4350-4354.
- VAUGHAN JL; MACMILLAN KL; ANDERSON GA. 2003. Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Aust. Vet. J*. 81: 64-68.
- VAUGHAN JL; MACMILLAN KL; D'OCCHIO MJ. 2004. Ovarian follicular wave characteristic in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 80: 353-361.
- VISCONTI PE; KOPF GS. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction* 59:1-6.
- VISCONTI PE; KOPF GS. 1998. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction*. 59:1-6.
- YANAGIMACHI R. 1994. Fertility of Mammalian spermatozoa: its development and relative. *Zygote*. 2: 371-372.
- WASSARMAN P. 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review Biochemistry*. 57: 415-442.
- WASSARMAN P; CHEN J; COHEN N; LITSCHER E; LIU C; HUAYU Q; ZEV W. 1999. Structure and Function of the Mammalian Egg Zona

- Pellucida. *Journal Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 285: 251 – 258.
- WASSARMAN P. 1999. Mammalian Fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. 96: 175 – 183.
- WASSARMAN P. 1999. Fertilization in animals. *Developmental Genetic*. 25: 83-86.
- WASSARMAN P; JOVINE L; LITSCHER E. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol* 3: E59-64.
- WASSARMAN P; JOVINE L; LITSCHER ES; QI H; WILLIAMS Z. 2004. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 115 Suppl 1:S57-60.
- WHEELER JC. 1988. Origin and evolution of the South American camelids. b: Thomsen GM. and Weide KD, Selected Papers from the 60th Western Veterinary Conference, 291.
- ZHU X; NAZ RK. 1999. Comparison of ZP3 protein sequences among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Frontiers in Bioscience*. 4:212-215.
- ZHUANG SZ; LI XJ; ZHANG AL; MA J; ZHENG YH; ZHANG FC. 2009. Transgenic RNAi-mediated reduction of LZP3 in *Lagurus lagurus* oocytes results in decreased fertilization ability in IVF. *Molecular Biology of Reports*. Publish online 20 March DOI 10.1007/s11033-009-9498-2.

<http://www.conacs.gob.pe/>

XII.- ANEXOS

Figuras y Diagramas.-

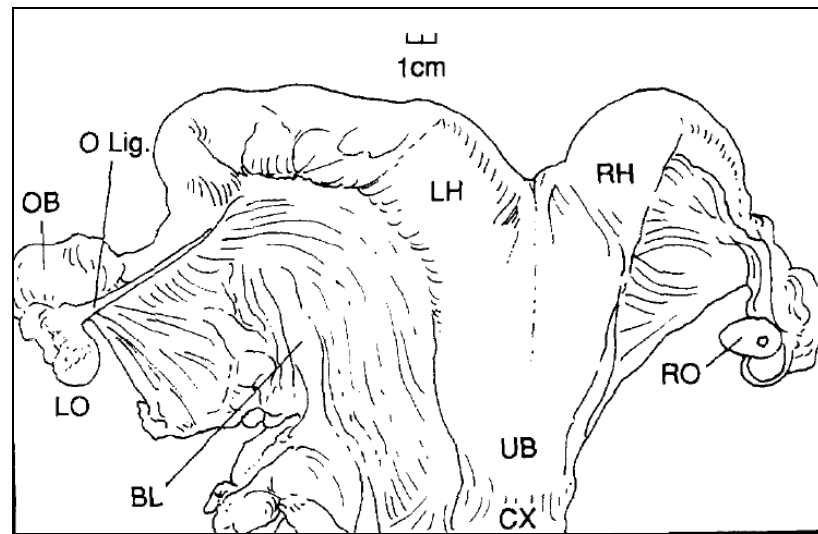


Figura 1.- Estructura Anatómica del Sistema Reproductor en Alpacas Hembras. OB. Bursa Ovárica, O Lig ligamento ovárico, LO y RO Ovario izquierdo y derecho, BL ligamento, CX cérvix, UB cuerpo uterino, LH y RH cuerno uterino izquierdo y derecho (Tomado de Del Campo *et al.*, 1995).

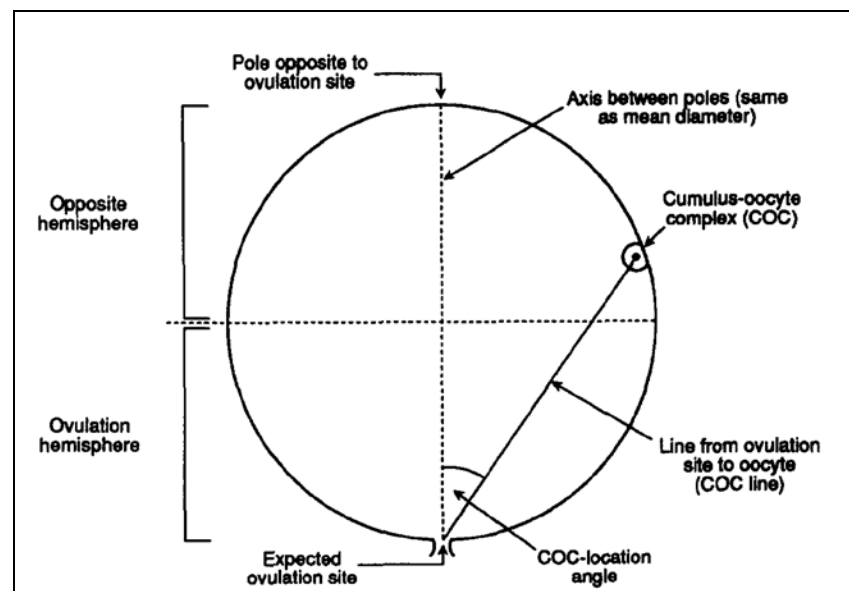


Figura 2.- Determinación de la localización del COC en la pared folicular. La forma folicular esférica es asumida, con un diámetro calculado por 3 dimensiones promedio. (Del Campo *et al.*, 1995)

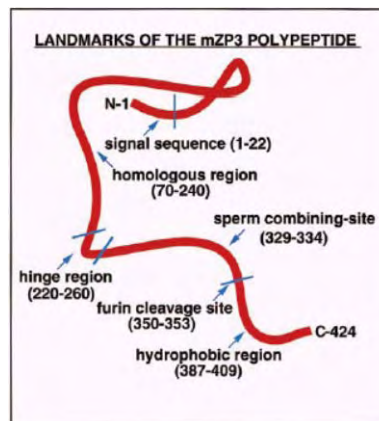


Figura 3.- Diagrama esquemático del polipéptido mZP3 con estructura específica y dominios funcionales indicados. (Tomado de Wassarman, *et al.*, 1999).

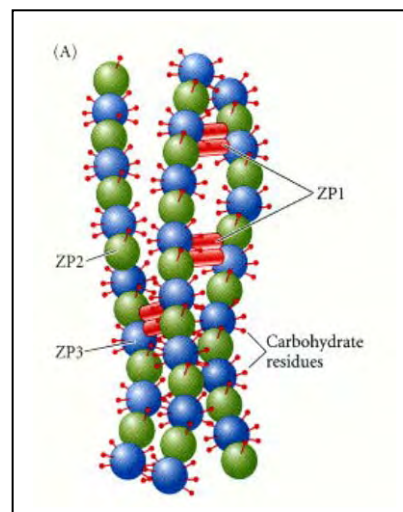


Figura 4.- La proteína ZP3 de ratón se une al espermatozoide. (A) Diagrama de la estructura fibrilar de la zona pelúcida de ratón. La cadena mayor de la zona esta compuesta por dímeros de proteínas ZP2 y ZP3. Esas cadenas son ocasionalmente ligadas junto con ZP1, formando una red. (Tomado de Wassarman, *et al.*, 2001)

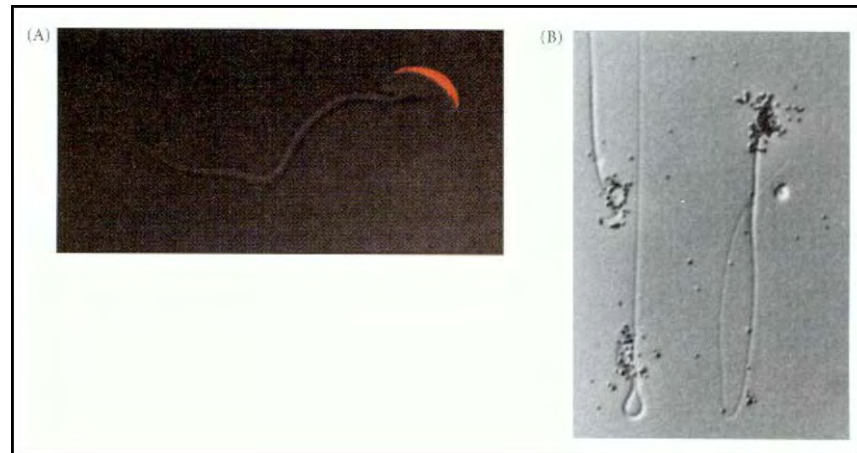


Figura 5.- (A) Las proteínas mZP3 se une a espermatozoides no reaccionados están localizadas en la membrana plasmática recubriendo el acrosoma. En esta imagen confocal, una proteína de unión a ZP3 es coloreada con color rojo inmunofluorescente (B) Radiomarcage de ZP3 unida a espermatozoides capacitados de ratón (Tomado de Gilber, 2005).

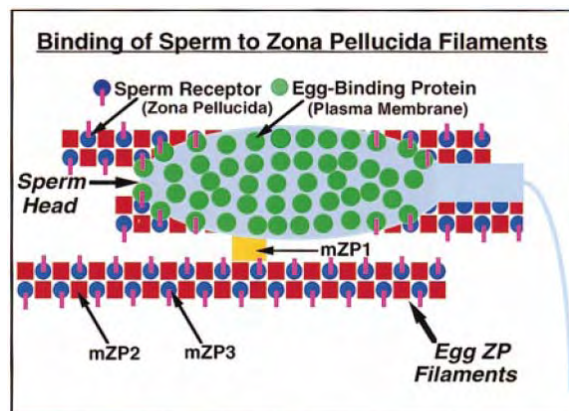


Figura 6.- Diagrama esquemático de características moleculares de la unión de un espermatozoide a la ZP. (Tomado de Wassarman, 1999).